

外泌体 microRNAs 与阿尔茨海默病关系的研究进展

刁华琼¹, 李小黎^{2*}, 林亮吟¹, 刘海鹏¹, 陈弘婧¹, 丁海月¹, 魏丹¹

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 北京中医药大学第三附属医院 脑病科, 北京 100029)

摘要: 阿尔茨海默病(AD)是老年期最常见的痴呆类型,具有起病隐匿、进行性发展的特点。外泌体微RNAs(miRNAs)可调节淀粉样前体蛋白的剪切、 β 淀粉样蛋白(A β)沉积及Tau蛋白磷酸化,影响神经炎性斑(NP)和神经原纤维缠结(NFT)的形成。此外,特定miRNAs经外泌体运输能穿过血脑屏障(BBB),抑制Tau蛋白磷酸化。检测外周血中外泌体miRNAs的表达谱有望成为诊疗AD的非侵入性方法。

关键词: 阿尔茨海默病;外泌体;微RNAs; β -淀粉样蛋白;Tau蛋白

中图分类号:R592 文献标志码:A

Progress on the correlation between exosomal microRNAs and Alzheimer's disease

DIAO Hua-qiong¹, LI Xiao-li^{2*}, LIN Liang-yin¹, LIU Hai-peng¹, CHEN Hong-jing¹,
DING Hai-yue¹, WEI Dan¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Department of Encephalopath, Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Alzheimer's disease is the most common dementia in the aged population and is characterized by hidden attack and progressive development. Some studies showed that exosomal microRNAs(miRNAs) regulates the shearing of amyloid precursor protein, deposition of beta-amyloid peptides(A β) and phosphorylation of Tau protein, influencing the generation of neuritic plaques and neurofibrillary tangles. In addition, special miRNAs can be transported by exosome across blood-brain-barrier and inhibit Tau phosphorylation. Measuring the expression profile of exosomal miRNAs in the peripheral blood may be a non-invasive diagnosis and treatment method of AD.

Key words: Alzheimer's disease; exosome; microRNAs; beta-amyloid peptide; Tau protein

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的中枢神经系统退行性病变,早期主要表现为记忆力、计算力、认知功能减退等症^[1]。国际阿尔茨海默病协会(Alzheimer's disease international, ADI)2018年公布数据,全球痴呆人数达5000万,2050年预计突破1.3亿,其中2/3以上为AD患者^[2],AD是老年期最常见的痴呆类型。随着中国人口老龄化程度持续加深,AD患者给社会带来的经济负担日益沉重。

据统计,2015年中国AD患者的社会经济费用总额约为1677.4亿美元,是2006年“世界老年痴呆症报告”中估计的5.95倍^[3]。如何更好的防治AD已成为神经精神科研究的热点。

目前尚不完全明确AD的发病机制,普遍认为与 β 淀粉样蛋白(beta-amyloid peptide, A β)的生成与清除失衡及Tau蛋白的过度磷酸化有关,其病理学典型改变包括神经炎性斑(neuritic plaques, NP)、神经纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)、神

收稿日期:2019-10-18 修回日期:2020-01-03

基金项目:国家自然科学基金(81673930)

*通信作者(corresponding author):tigerlx2002@163.com

神经元缺失和胶质增生等^[1]。常用治疗 AD 的乙酰胆碱酯酶 (acetylcholine esterase, ACHE) 抑制剂和 N-甲基-D-天冬氨酸 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA) 受体拮抗剂仅为对症用药,并不能逆转或终止 AD 的病理进程。截至 2018 年 4 月,已有超过 1 000 个针对 A β 和 Tau 蛋白的新药研究在临床试验的不同阶段宣告失败^[4],AD 的治疗是国际公认的医学难题。近年大量研究表明外泌体可调节 A β 的沉积及 Tau 蛋白的磷酸化,特定 miRNAs 通过外泌体运输可穿过血脑屏障,减轻 AD 的临床症状^[5-8]。本文通过整理相关文献,旨在回顾外泌体 miRNAs 与 AD 关系近年的研究进展,总结并提出相关问题及建议。

1 外泌体 miRNAs 的来源

外泌体是多囊泡体 (multivesicularbodies, MVBs) 与质膜融合后形成的 40~100 nm 的膜性囊泡,其携带的 miRNAs 为非编码蛋白的小 RNA 分子,具有明显的细胞间信息传递功能,与 AD、帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 等^[9] 多种神经系统疾病的发生发展相关。外泌体 miRNAs 可在脑脊液、血液、尿液等体液中检出。脑脊液被认为是 AD 生物标志物的最佳来源,但腰椎穿刺属侵入性操作,存在局麻药过敏及颅内感染等风险。采取外周血不仅操作简便,感染风险较小,而且血浆中外泌体 miRNAs 表达丰富,稳定性较高^[10],增加了其作为诊断 AD 生物标志物的可行性及试验的可重复性。近年研究发现基于适体的荧光偏振测定 (AFPExo 测定) 法及荧光纳米颗粒 WO2002/088706 试剂盒均能用于血浆外泌体 miRNAs 表达谱的检测^[11-12]。前者检测的灵敏度高,约 30 min 可出结果,后者较传统方法 FISH (荧光原位杂交) 和 ELISA (酶联免疫吸附测定) 所需的实验成本较低,外泌体 miRNAs 的检测方法得到了进一步完善。

2 外泌体 miRNAs 与 AD 发病

2.1 外泌体 miRNAs 与 APP

淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 是 A β 形成的前体蛋白,受外泌体 miRNAs 剪接影响。健康人脑以 APP695 表达为主,当特定 miRNAs 广泛缺乏时,APP695 的表达下调,A β 生成增

多^[13]。APP 3' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 是 miRNA 靶向调控 APP 表达的关键区域,外泌体 miR-101-3p、miR-153-3p 等可通过结合 APP 3'UTR 抑制 APP 在人脑细胞中的表达,而上述 miRNAs 在 AD 患者脑中表达下调^[14]。此外,miRNAs 可通过特定的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 影响 APP 的转录和转录后表达。在用 APP-118C/A CC,CA 和 AA 基因型质粒转染的 HeLa 细胞中,miR-101-3p、miR-144-3p、miR-153-3p 和 miR-381-3p 转染的 APP 分别在 CA、AA 基因型质粒中检测出最高和最低水平^[5],APP 3'UTR 区域中-118C/A 位点的遗传变异可影响 miRNA 对 APP 表达的调节。

2.2 外泌体 miRNAs 与 A β 、Tau 蛋白

β 淀粉样蛋白 (β -amyloid peptide, A β) 的生成与清除失衡致使 A β 沉积是阿尔茨海默病病理损伤的始动因素,可促使 NP 形成^[1]。外泌体相关蛋白 Alix 在 AD 患者脑切片淀粉样斑块中呈现特异性聚集,而健康人基本不存在,提示 A β 可能受外泌体影响^[6]。NFT 是 Tau 蛋白过度磷酸化的结果,最早出现在内嗅皮质和海马区,miR-181c-5p 的血清表达下降与血浆 A β 水平升高、左内嗅皮质体积减小有关^[7],外泌体 miR-138 通过视黄酸受体 α /糖原合成酶激酶-3 β (RARA/GSK-3 β) 途径,可促进 N2a 细胞中的 Tau 蛋白磷酸化^[8],加速 NFT 形成。进一步说明了 miRNAs 与 A β 、Tau 蛋白的关系。

3 外泌体 miRNAs 与 AD 的早期诊断

AD 的亚临床潜伏期可长达 20 余年,在出现明显的临床症状及影像学改变前,AD 患者大脑海马区可能已存在相关的病理变化,探索早期诊断 AD 的生物标志物具有重要意义。有学者指出:脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中 A β 1-42、T-Tau 和磷酸化 Tau 蛋白浓度是 AD 临床实践和研究中广泛使用的诊断标志物,且以上标志物在脑脊液及外周血中对诊断 AD 的价值一致^[15],外周血作为相关标志物来源具有可行性。

大脑神经元发生病变、凋亡后,其产生的外泌体 miRNAs 可通过血脑屏障被释放到血液中,研究证明 AD 组与对照组血浆中外泌体 miRNAs 常存在差异。AD 患者外周血中 miR-9-5p 和 miR-598 较健康

受试者高^[16], miR-135b 较健康受试者低^[17], 主观认知障碍 (subjective cognitive decline, SCD)、痴呆期 (dementia of Alzheimer type, DAT) 和 MCI (mild cognitive impairment, MCI) 患者血清外泌体内 miR-193b 水平均较健康对照组低, 且 DAT 组低于 MCI 组, MCI 组低于 SCD 组^[18], 外泌体 miRNAs 水平可随 AD 病程进展而变化, 但尚不明确外泌体 miR-193b 水平在 AD 患者脑中的变化情况。

4 外泌体 miRNAs 与 AD 的治疗

4.1 抑制 A β 、Tau 蛋白水平

病理状态下, APP 由 β -分泌酶 (β -site APP cleaving enzyme, BACE) 和 γ -分泌酶分解, 产生具有神经毒性的 A β 42。过表达的 miR-22-3p 可靶向并调节促分裂原激活蛋白激酶 14 (MAPK14), 抑制 A β 42 水平, 改善小鼠的空间记忆力^[19]。 β -淀粉样前体蛋白裂解酶 1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1) 是 A β 产生的关键限速酶, 神经细胞中外泌体 miR-186^[20] 可直接结合 BACE1 基因的 3'UTR, 减少 A β 生成。糖原合成酶激酶 3 β (GSK3 β) 是参与 Tau 蛋白磷酸化的主要激酶, miR-124-3p 可靶向微囊蛋白 1 (caveolin-1), 通过 caveolin-1-PI3K/Akt/GSK3 β 途径, 抑制 Tau 蛋白过度磷酸化^[21]。此外, 通过无创鼻腔给药, miR-146a agomir (M146AG) 可改善 APP/PS1 转基因小鼠的认知障碍, 并减轻 AD 小鼠模型 A β 沉积和海马中的 Tau 磷酸化^[22]。遗憾的是, 目前尚不能够证实外泌体 miRNAs 可调节 A β 的清除机制。

4.2 拮抗神经毒性

AD 的发生发展伴随着慢性炎症反应过程。小胶质细胞作为中枢神经系统的免疫细胞, 在 AD 的病程中可被广泛激活, 表达出致神经元损伤的肿瘤坏死因子 α (TNF- α)。研究发现, N2a 细胞中的 miR-137 可通过抑制 TNF- α 诱导的蛋白表达, 降低 A β 诱导的神经毒性^[23]; 快速老化 SAMP8 小鼠中 miR-135b 可靶向 BACE1, 增强海马细胞的增殖, 促

进小鼠学习和记忆能力恢复^[16], 具有神经保护作用。另外, miR-132 的两个关键靶点 PTEN 和 FOXO3a 在 AD 脑中均被上调, 褪黑素可通过 miR-132/PTEN/AKT/FOXO3a 途径在 A β 诱导的神经毒性中发挥其神经保护作用^[24]。

4.3 作为新型运输载体

血-脑屏障 (blood-brain-barrier, BBB) 选择性地调节各种物质的渗透性以保持中枢神经系统内环境的稳定, 虽是人体的保护性屏障, 但药物成分不易通过 BBB 成为治疗 AD 的另一难题。研究发现, 姜黄素具有抗氧化、抗感染作用, 经特定外泌体运输穿过血脑屏障后可抑制 AKT/GSK-3 β 相关的 Tau 蛋白磷酸化, 改善 AD 大鼠的认知功能^[25]。此外, 外泌体可运输 miR-124 促进脑损伤后小胶质细胞 M2 极化, 改善海马神经功能恢复^[26], 其有望成为治疗 AD 的新靶标。

5 问题与展望

外泌体 miRNAs 与 AD 的关系具有良好的研究前景, 深入研究外泌体 miRNAs 与 APP、A β 、Tau 蛋白的关系可加深对 AD 发病机制的认识。从已有的试验数据中可归纳出数十种与 AD 相关的外泌体 miRNAs, 但其对于诊疗 AD 是否具有特异性尚不明确。可尝试增加试验样本量, 统一试验操作标准, 深入研究特异性外泌体 miRNAs 对 AD 的诊疗意义。现有外泌体 miRNA 作为 AD 生物诊断标志物的研究样本多采自外周血, 外泌体可运输 miRNAs 穿过血-脑屏障减轻 AD 症状具有一定的创新性优势。目前尚不知血液、脑脊液及脑组织中其他物质交换是否会受此影响而产生病理变化, 其安全性有待考证。此外, 中医药辨证治疗 AD 亦能取得显著的临床疗效, 已知姜黄素可通过血浆外泌体运输穿过脑屏障抑制 Tau 蛋白磷酸化, 可进一步研究常用治 AD 的中药如葛根、五味子、银杏叶制剂等, 是否也通过影响外泌体 miRNAs 表达而减轻 AD 临床症状, 拓展 AD 的诊疗思路。

参考文献:

[1] 饶明俐. 阿尔茨海默病 // 吴江, 贾建平. 神经病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 364-365.

[2] Patterson C. World Alzheimer report 2018: the State of the art of dementia research; new frontiers [R]. Alzheimer's dis-

- ease international (ADI): London, UK. 2018. Accessed at <https://www.alz.co.uk/news/world-alzheimer-report-2018-state-of-art-of-dementia-research-new-frontiers>.
- [3] Jia J, Wei C, Chen S, *et al.* The cost of Alzheimer's disease in China and re-estimation of costs worldwide [J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14: 483-491.
- [4] 王涛. 基于阿尔茨海默病病理假说的新药研发现状及展望(英文) [J]. *上海精神医学*, 2017, 29: 237-239.
- [5] Zhou Q, Luo L, Wang XH, *et al.* Relationship between single nucleotide polymorphisms in the 3'UTR of amyloid precursor protein and risk of Alzheimer's disease and its mechanism [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39: doi: 10.1042/BSR20182485.
- [6] Rajendran L, Honscho M, Zahn TR, *et al.* Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103: 11172-11177.
- [7] Manzano-Crespo M, Atienza M, Cantero J. Lower serum expression of miR-181c-5p is associated with increased plasma levels of amyloid-beta 1-40 and cerebral vulnerability in normal aging [J]. *Transl Neurodegener*, 2019, 8: doi: 10.1186/s40035-019-0174-8.
- [8] Wang X, Tan L, Lu Y, *et al.* MicroRNA-138 promotes tau phosphorylation by targeting retinoic acid receptor alpha [J]. *FEBS Lett*, 2015, 589: 726-729.
- [9] Mao R, Garfinkel BP, Soreq H. Alzheimer's disease and ncRNAs [J]. *Adv Exp Med Bio*, 2017, 978: 337-361.
- [10] Kumar S, Reddy PH. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1862: 1617-1627.
- [11] Zhang Z, Tang C, Zhao L, *et al.* Aptamer-based fluorescence polarization assay for separation-free exosome quantification [J]. *Nanoscale*, 2019, 11: 10106-10113.
- [12] Park JS, Kim ST, Kim SYA, *et al.* A novel kit for early diagnosis of Alzheimer's disease using a fluorescent nanoparticle imaging [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: doi: 10.1038/s41598-019-49711-y.
- [13] 赵娟娟, 岳东旭, 褚风云, 等. 微小 RNAs 在阿尔茨海默病 A β 沉积和 Tau 磷酸化中的作用 [J]. *生命科学*, 2017, 29: 507-513.
- [14] Patel AA, Ganepola GAP, *et al.* The potential role of dysregulated miRNAs in Alzheimer's disease pathogenesis and progression [J]. *Alzheimers Dis*, 2019, 67: 1123-1145.
- [15] Jia L, Qiu Q, Zhang H, *et al.* Concordance between the assessment of A β 42, T-tau, and P-T181-tau in peripheral bloodneural-derived exosomes and cerebrospinal fluid [J]. *Alzheimers Dement*, 2019, 15: 1071-1080.
- [16] Riancho J, Vázquez-Higuera J, Pozueta A, *et al.* Exosome-encapsulated microRNAs as promising biomarkers for Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 57: 483-491.
- [17] Zhang Y, Xing H, Guo S, *et al.* MicroRNA-135b has a neuroprotective role via targeting of β -site APP-cleaving enzyme 1 [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12: 809-814.
- [18] 刘辰庚, 杨婷婷, 王培昌. 血清外泌体 miRNA-193b 诊断阿尔茨海默病的价值 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34: 3621-3624.
- [19] Ji Q, Wang X, Cai J, *et al.* miR-22-3p regulates amyloid β deposit in mice model of Alzheimer's disease by targeting mitogen-activated protein kinase 14 [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2019, 18: 285-291.
- [20] Kim J, Yoon H, Chung D, *et al.* miR-186 is decreased in aged brain and suppresses BACE1 expression [J]. *Neurochem*, 2016, 137: 436-445.
- [21] Kang Q, Xiang Y, Li D, *et al.* miR-124-3p attenuates hyperphosphorylation of tau protein induced apoptosis via caveolin-1-PI3K/Akt/GSK3 β pathway in N2a/APP695swe cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8: 24314-24326.
- [22] Mai H, Fan W, Wang Y. Intranasal administration of miR-146a agomir rescued the pathological process and cognitive impairment in an AD mouse model [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 681-695.
- [23] He D, Tan J, Zhang J. miR-137 attenuates A β -induced neurotoxicity through inactivation of NF- κ B pathway by targeting TNFAIP1 in Neuro2a cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490: 941-947.
- [24] Zhao Y, Zhao R, Wu J, *et al.* Melatonin protects against A β -induced neurotoxicity in primary neurons via miR-132/PTEN/AKT/FOXO3a pathway [J]. *Biofactors*, 2018, 44: 609-618.
- [25] Wang H, Sui H, Zheng Y, *et al.* Curcumin-primed exosomes potently ameliorate cognitive function in AD mice by inhibiting hyperphosphorylation of the Tau protein through the AKT/GSK-3 pathway [J]. *Nanoscale*, 2019, 11: 7481-7496.
- [26] Yang Y, Ye Y, Kong C, *et al.* miR-124 enriched exosomes promoted the M2 polarization of microglia and enhanced hippocampus neurogenesis after traumatic brain injury by inhibiting TLR4 pathway [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44: 811-828.